ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส จากกระถินบ้าน

Antioxidant activity of chitooligosaccharides produced by chitinase from *Leucaena leucocephala* de wit

มานะ ขาวเมฆ* และวรางคณา เทศทอง
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
**ผู้นิพนธ์หลัก (Corresponding Author) E-mail: mana@vru.ac.th*

Received: March 28,2021 Revised: June 12,2021 Accepted: June 30,2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์ ด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 พบว่ามีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.701 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.050 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2.572 ยูนิตต่อมิลลิกรัม พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ พีเอช 4.5 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการใช้เวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะมีขนาดโมเลกุลต่างกัน เมื่อใช้เวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ ($(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$) ลดลงในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็ก ($(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$) เพิ่มขึ้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากช่วงเวลาการบ่ม 30 นาที มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.21$\pm$0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และดีกว่าสารมาตรฐานบิวทิลไฮดรอกซิโทลูอีน

คำสำคัญ: เอนไซม์ไคติเนส, ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์, ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ, กระถินบ้าน

Abstract

This research was to study antioxidant activity of chitooligosaccharides produced by chitinase from *Leucaena leucocephala* de wit. Chitinase was extracted from 2 week old germinated of *Leucaena leucocephala* de wit with 0.1 M sodium acetate buffer pH 4.5. It had activity of 2.701 unit/mL, protein of 1.050 mg/mL, and specific activity of 2.572 unit/mg. The

pH and temperature optimum for the catalyst were 4.5 and 4 5 ℃, respectively. Chitooligosaccharides was cured for 30 min, 1 h, 2 h, and 4 h that showed the different at intervals. The large molecules of chitooligosaccharides ($(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_6$) were deceased while the small molecules ($(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ and $(GlcNAc)_3$) were increased. Chitooligosaccharides were incubated for 30 min had the highest antioxidant activity and better than the standard butylated hydroxytoluene (BHT) with EC_{50} of 1.21±0.1 µg/mL.

Keywords: Chitinase, Chitooligosaccharides, Antioxidant Activity, *Leucaena leucocephala* de wit

บทนำ

ไคติเนสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายไคตินซึ่งเป็นสารชีวพอลิเมอร์ของเอนอะซิติลกลูโคซามีน (GlcNAc) ซึ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิก ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวต่าง ๆ กัน ($(GlcNAc)_2$ - $(GlcNAc)_6$) (Tripathi and Dubey, 2004) ไคติเนสพบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พืช เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ มีความสำคัญด้านอุตสาหกรรมการเกษตรใช้ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแมลง (Chernin et al, 1997)

ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยมอนอแซคคาไรด์ของเอนอะซิติลกลูโคซามีนตั้งแต่ 2 โมเลกุลถึง 10 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อด้วยพันธะเบตา 1,4 ไกลโคซิดิกของเอนอะซิติลกลูโคซามีนและกลูโคซามีน เกิดจากการย่อยสลายไคตินและไคโตซานด้วยปฏิกิริยาเคมีโดยใช้กรด หรือการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มไคติโนไลติก เช่น เอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์ไคโตซาเนสที่พบในพืชหลายชนิด เช่น กระถินบ้าน ก้ามปู ข้าว ข้าวฟ่าง ถั่ว ยาสูบ และองุ่น (Yin et al, 2010) ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ละลายน้ำได้ดีกว่าไคตินและไคโตซาน จึงมีประสิทธิภาพการดูดซึมดีกว่าและทำให้มีมูลค่าสูงกว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ถูกนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ต้านมะเร็ง ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งแบคทีเรีย ยับยั้งเชื้อรา และสร้างภูมิต้านทาน (Park et al, 2004) จากการวิจัยของมานะ ขาวเมฆ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์ สามารถยังยั้งเชื้อราได้ดี (มานะ ขาวเมฆ, 2563) และไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยของเอนไซม์ไคโตซาเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดี (มานะ ขาวเมฆ, 2562) ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์ไคติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูง (พูนศุข ศรีโยธา และ John Peberdy, 2539) และอยู่ในกลุ่มไคติโนไลติกเช่นเดียวกับเอนไซม์ไคโตซาเนส จากต้นอ่อนกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์ มาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ไคติเนส
2. เพื่อศึกษารูปแบบและปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์

วิธีการวิจัย

1. สกัดไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ตามวิธีของมานะ ขาวเมฆ (2563)
2. หาค่ากิจกรรมของไคติเนสตามวิธีของของมานะ ขาวเมฆ (2563)
3. หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีตามวิธีของมานะ ขาวเมฆ (2563)
4. ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาตามวิธีของมานะ ขาวเมฆ (2563)
5. เตรียมไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตามวิธีของมานะ ขาวเมฆ (2563)
6. ตรวจสอบรูปแบบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตามวิธีของมานะ ขาวเมฆ (2563)
7. หาปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ตามวิธีของมานะ ขาวเมฆ (2563)
8. ศึกษาการหาปริมาณอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-ไดเฟนิล-1-พิไคลดราซิล (Diphenyl-1-picrylhydrazyl Scavenging Capacity, DPPH) (Brand et al.,1995)

8.1 เตรียมสารละลาย DPPH radical ในเอทานอลเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

8.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานของบิวทิเลเตดไฮดรอกซิโทลูอีน (Butylated Hydroxytoluene; BHT) เข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ในเอทานอล ปิเปตสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำ 3 ซ้ำ สร้างกราฟมาตรฐานของบิวทิเลเตดไฮดรอกซิโทลูอีน ระหว่างค่าร้อยละการยับยั้งกับค่า log ความเข้มข้นของ BHT และหาค่า EC_{50} ซึ่งเป็นค่าแสดงถึงปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ความเข้มข้นของ DPPH• ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จาก

$$\text{ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (Percent Scavenging)} = x100 \quad \frac{(A_{Control} - A_{Sample})}{A_{Control}}$$

$A_{Control}$ คือ A_{517} ตัวควบคุม A_{Sample} คือ A_{517} สารตัวอย่าง

8.3 เตรียมสารตัวอย่างเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร ปิเปตสารตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร เติม DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ตั้งในที่มืดอุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร ทำ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BHT คำนวณหาค่าการต้านอนุมูลอิสระและค่า EC_{50}

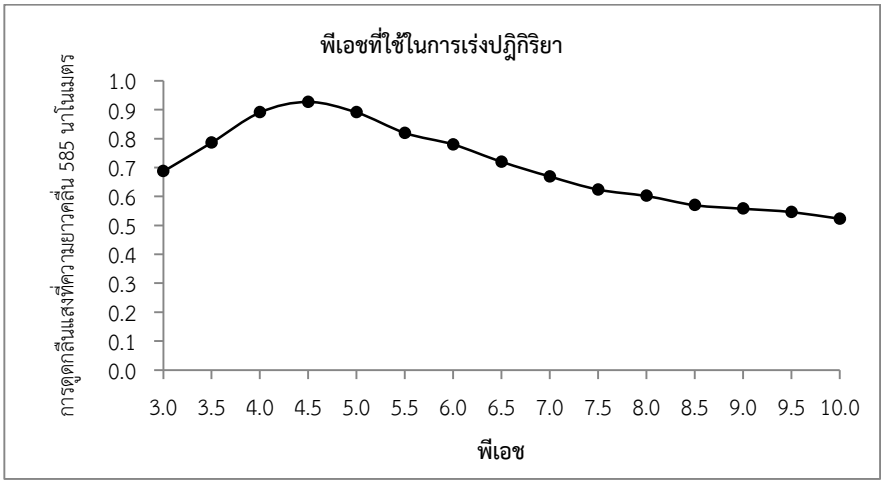
ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. การหาค่ากิจกรรม ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมจำเพาะ

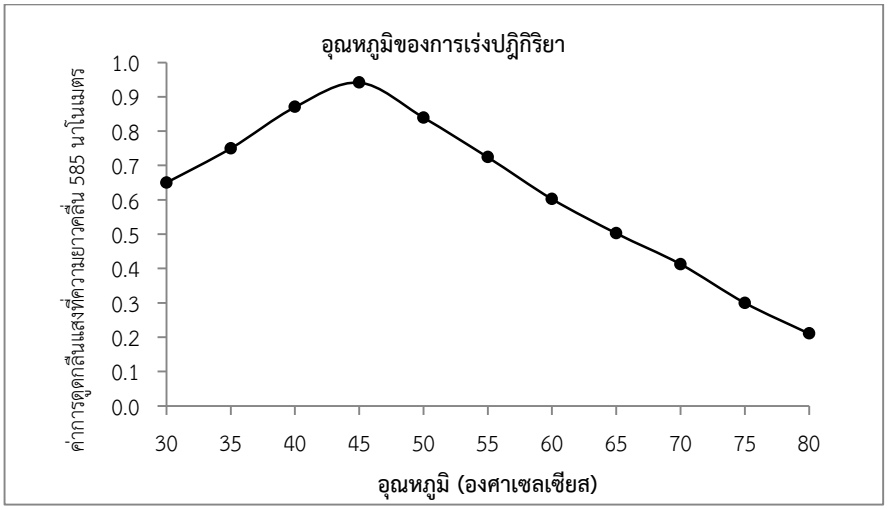
เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์ ด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตต บัฟเฟอร์พีเอช 4.5 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.701 ยูนิต/มิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.050 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำค่ากิจกรรมและปริมาณโปรตีนมาคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าเท่ากับ 2.572 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบไคติเนสที่สกัดได้จากต้นอ่อนกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าจากแหล่งอื่น เช่น ไคติเนสจาก *Bacillus sp.* Strain KCTC0377BP มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1.9582 ยูนิต/มิลลิกรัม (Senol et al., 2014) และไคติเนส จาก *Paenibacillus fukunensis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.0122 ยูนิต/มิลลิกรัม (Yong et al., 2017) ดังนั้น ไคติเนสจากพืชมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกว่าเอนไซม์ไคติเนสจากแบคทีเรียและเชื้อราบางสายพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากไคติเนสจากพืชส่วนใหญ่จะเป็นชนิดภายใน (Endo Type) ที่การสลายพันธะแบบสุ่ม จึงสามารถจับกับโครงสร้างไคตินได้ดีกว่า

2. การศึกษาพีเอชและอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา

เมื่อนำไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้าน อายุ 2 สัปดาห์ มาหาค่ากิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาที่พีเอช 3.0-10.0 พบว่าพีเอชที่ไคติเนสเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดเท่ากับ 4.5 ดังภาพที่ 1 และเมื่อหาค่ากิจกรรมในการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ไคติเนสเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 2



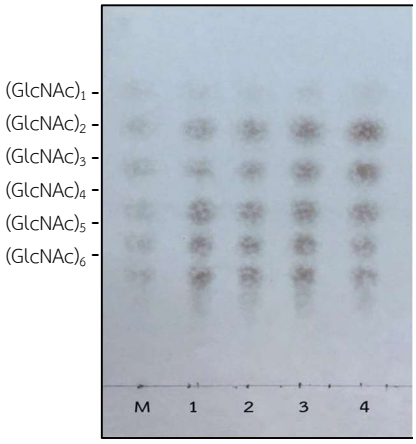
ภาพที่ 1 กราฟแสดงการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสในช่วงพีเอช 3.0 - 10.0



ภาพที่ 2 กราฟแสดงการเร่งปฏิกิริยาของไคติเนสในช่วงอุณหภูมิ 30 – 80 องศาเซลเซียส

3. การหารูปแบบของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (COS)

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสลาย1 เปอร์เซ็นต์ของคอลลอยไอดอลไคตินด้วยไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.5 มาศึกษารูปแบบด้วย TLC พบว่า เมื่อใช้เวลาที่ใช้ในการบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง จะได้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดโมเลกุลต่างๆ กันของ $(GlcNAc)_1$- $(GlcNAc)_6$, แต่เมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้นเป็น 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง โมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ ลดลงในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ ($GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ เพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 3 และเมื่อเปรียบเทียบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากไคติเนสจากแหล่งต่าง ๆ จะมีรูปแบบต่างกัน เช่น ไคติเนสจากแบคทีเรีย *S. marcescens* PRNK-1 จะมีรูปขนาด $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_4$ เมื่อใช้เวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นจะทำให้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีขนาดเล็กลงเป็น $(GlcNAc)_1$ และ $(GlcNAc)_2$ (Tripathi & Dubey, 2004)



ภาพที่ 3 รูปแบบของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสลายคอลลอยไอดอลไคตินที่ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 ที่ใช้เวลาบ่มต่างกัน M: สารมาตรฐานไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 1-6 โมเลกุล ($(GlcNAc)_{1-6}$), 1: ใช้เวลาบ่ม 30 นาที 2: ใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง 3: ใช้เวลาบ่ม 2 ชั่วโมง และ 4: ใช้เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง

4. การหาปริมาณร้อยละของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยไอดอลไคติน 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยไคติเนส จากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูงและเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเอนอะซิติลกลูโคซามีนและไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาด 2 – 6 โมเลกุล พบว่า ปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนกระถินบ้านที่ได้จาการบ่มในช่วงเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมงมี $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ ร้อยละ 2.17-3.50, 6.83-16.33, 14.00-27.33, 6.83-15.00, 11.67-15.33 และ 34.33-46.67 ตามลำดับ และพบว่าปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อยจะมีปริมาณมากแต่จะลดลงเมื่อใช้เวลาในการบ่มมากขึ้น ในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ เพิ่มขึ้น แสดงว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$ เปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_2$, $(GlcNAc)_5$ เปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_6$ เปลี่ยนไปเป็น $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_4$ หรือ $(GlcNAc)_3$ และ $(GlcNAc)_3$ ดังตารางที่ 1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของมูนและคณะ (Moon et al., 2017) ที่สกัดไคติเนส จากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* PRNK-1 ที่ย่อยคอลลอยไอดอลไคตินแล้วหาปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า เมื่อใช้เวลาในการบ่มน้อยจะมีปริมาณของ $(GlcNAc)_6$ มากที่สุด รองมาเป็น $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_4$ ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณของโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$ รวมกันจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 1.38, 1.74, 2.12 และ 2.83 ไมโครกรัม/10 ไมโครลิตร เมื่อใช้เวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่โมเลกุลขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$,

$(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ รวมกันมีปริมาณลดลงเป็น 4.62, 4.26, 3.88และ 3.17 ไมโครกรัม/10 ไมโครลิตร เมื่อใช้เวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ปริมาณของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดจากการบ่มคอลลอยไอดอลไคตินกับไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่ใช้เวลาในการบ่มต่าง ๆ

ที่	เวลาที่ใช้บ่ม	ปริมาณของสารแต่ละชนิด													
		$(GlcNAc)_1$		$(GlcNAc)_2$		$(GlcNAc)_3$		$(GlcNAc)_4$		$(GlcNAc)_5$		$(GlcNAc)_6$		รวม	
		%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg	%	µg
1	30 นาที	2.17	0.13	6.83	0.41	14.00	0.84	15.00	0.90	15.33	0.92	46.67	2.80	100	6.00
2	1 ชั่วโมง	2.67	0.16	9.33	0.56	17.00	1.02	13.33	0.80	14.17	0.85	43.50	2.61	100	6.00
3	2 ชั่วโมง	3.00	0.18	13.33	0.80	19.00	1.14	11.33	0.68	13.50	0.81	39.83	2.39	100	6.00
4	4 ชั่วโมง	3.50	0.21	16.33	0.98	27.33	1.64	6.83	0.41	11.67	0.70	34.33	2.06	100	6.00

5. การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-ไดเฟนิล-1-พิไคลดราซิล (DPPH)

เมื่อนำไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อยคอลลอยไอดอลไคตินด้วยไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ที่ใช้เวลาบ่ม 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มาศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของการยับยั้ง DPPH ด้วย BHT ที่มี EC_{50} = 1.34±0.1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่า โคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากไคติเนสซึ่งสกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านที่บ่มด้วยเวลา 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง มีค่าการต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 14.96±0.1 - 85.47±0.1, 25.47±0.1 – 86.39±0.1, 8.40±0.1 – 88.05±0.1 และ 25.76±0.1 – 81.29±0.1 ตามลำดับ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.21±0.1, 1.23±0.1, 1.27±0.1 และ 1.33±0.1 ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3 และภาพที่ 4 ถึงภาพที่ 8 ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการบ่มทุกช่วงเวลามีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระดีกว่าสารมาตรฐาน BHT และดีกว่าไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยคอลลอยไอดอลไคตินด้วยเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum* CECT 2413 ที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ร้อยละ 10 (Kidibule et al., 2020)

เมื่อเปรียบเทียบไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อยคอลลอยไอดอลไคตินด้วยไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์กับสารสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ พบว่า ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาการย่อยคอลลอยไอดอลไคตินด้วยไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบด้วยค่า EC_{50} เช่น สารสกัดจากใบกฤษณาที่สกัดจากเมทานอล น้ำ และเฮกเซนที่มีค่า EC_{50} เท่ากับ 28.78, 45.79 และ 877 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ราตรี พระนคร, 2559)

และสารสกัดจากการตัดแต่งจากเห็ดหอมที่สกัดด้วยเอทานอลมีค่า EC_{50} เท่ากับ 1.93 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (Santhi et al., 2016)

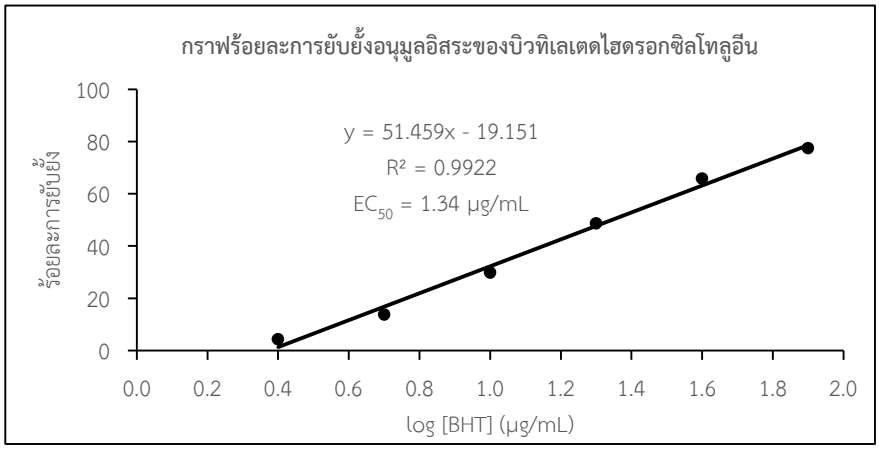
ตารางที่ 2 การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ด้วย BHT

ความเข้มข้น BHT (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การต้านอนุมูลอิสระ (%)	EC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
2.5	4.37±0.1	1.34±0.1
5	13.84±0.1	
10	29.90±0.1	
20	48.75±0.1	
40	65.83±0.1	
80	77.47±0.1	

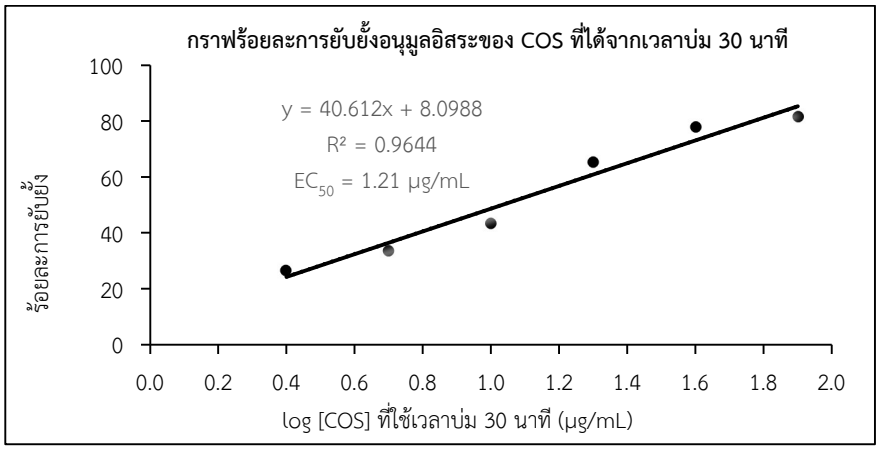
ตารางที่ 3 การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการย่อยของไคติเนสจากต้นอ่อนกระถินบ้านด้วยวิธี DPPH

เวลาที่ใช้ในการบ่ม	ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	การต้านอนุมูลอิสระ (%)	EC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)
30 นาที	2.5	14.96±0.1	1.21 ±0.1
	5.0	23.09±0.1	
	10	37.41±0.1	
	20	52.61±0.1	
	40	69.66±0.1	
	80	85.47±0.1	
1 ชั่วโมง	2.5	25.47±0.1	1.23±0.1
	5.0	31.62±0.1	
	10	43.95±0.1	
	20	61.70±0.1	
	40	77.69±0.1	
	80	86.39±0.1	
2 ชั่วโมง	2.5	8.40±0.1	1.27±0.1
	5.0	21.66±0.1	

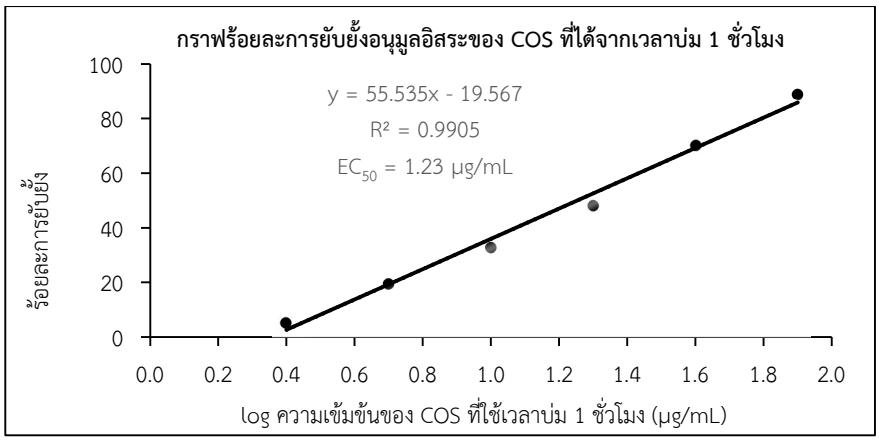
	10	30.80±0.1	
	20	47.30±0.1	
	40	67.24±0.1	
	80	88.05±0.1	
4 ชั่วโมง	2.5	25.76±0.1	1.33±0.1
	5.0	29.34±0.1	
	10	39.07±0.1	
	20	53.31±0.1	
	40	72.79±0.1	
	80	81.29±0.1	



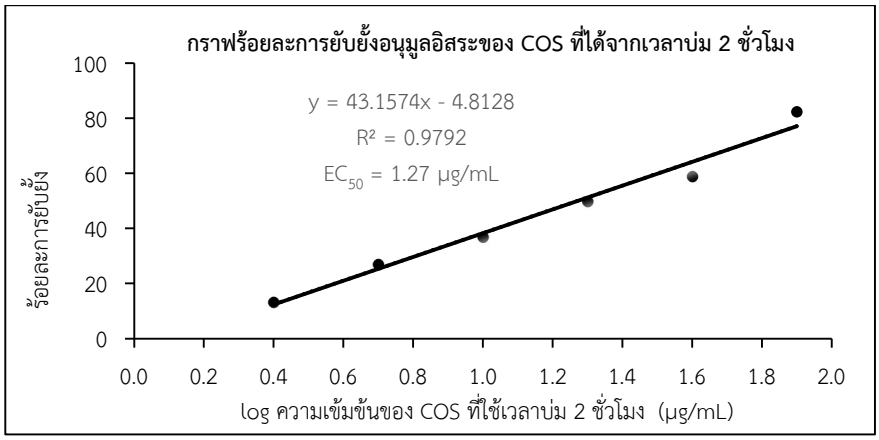
ภาพที่ 4 กราฟร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของบิวทิลไฮดรอกซิโทลูอีน (BHT)



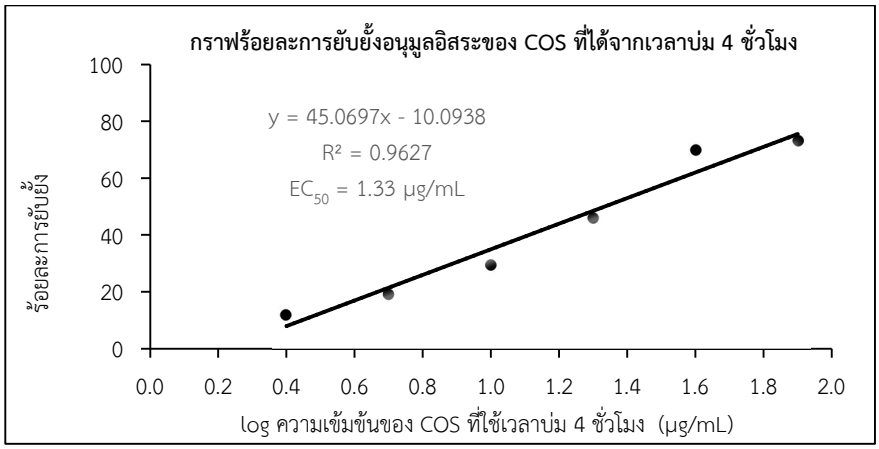
ภาพที่ 5 กราฟร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เวลาบ่ม 30 นาที



ภาพที่ 6 กราฟร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เวลาบ่ม 1 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 กราฟร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เวลาบ่ม 2 ชั่วโมง



ภาพที่ 8 กราฟร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้เวลาบ่ม 4 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย

เอนไซม์ไคติเนสที่สกัดจากต้นอ่อนกระถินบ้านอายุ 2 สัปดาห์ ด้วย 0.1 โมลาร์ ของโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์พีเอช 4.5 พบว่ามีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2.7011 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.0500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2.5725 ยูนิตต่อมิลลิกรัม พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ พีเอช 4.5 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อย 1 เปอร์เซ็นต์คอลลอยไอดอลไคตินที่ 30 นาที 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง พบว่าได้ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีขนาดโมเลกุล $(GlcNAc)_1$ - $(GlcNAc)_6$ เมื่อใช้เวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นไคโตโอลิโกแซคคาไรด์โมเลกุลขนาดใหญ่ ($(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$) ลดลงในขณะที่โมเลกุลขนาดเล็ก ($(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$) เพิ่มขึ้น ไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มทุกช่วงเวลาสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารมาตรฐาน BHT โดยไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการบ่มที่เวลา 30 นาที จะมีไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ของ $(GlcNAc)_4$, $(GlcNAc)_5$ และ $(GlcNAc)_6$ จะมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการบ่มช่วงเวลา 1 ชั่วโมง 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กของ $(GlcNAc)_1$, $(GlcNAc)_2$ และ $(GlcNAc)_3$

เอกสารอ้างอิง

พูนศุข ศรีโยธา,John Peberdy. (2539) เอนไซม์สลายไคตินและคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี:นครราชสีมา.

มานะ ขาวเมฆ. (2563). ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากต้นอ่อนก้ามปู กระถินบ้าน ข้าว กข. 6 และข้าวฟ่าง เคยู 630 ที่ผลิตด้วยเอนไซม์ไคติเนส. วารสารวิจัยและพัฒนาวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 15 (2), 119-130.

มานะ ขาวเมฆ. (2562). การต้านอนุมูลอิสระของไคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตด้วยไคโตซาเนสจากก้ามปู กระถินบ้าน กระถินบ้าน และข้าวฟ่าง เคยู 630. วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 14 (3), 62-71.

ราตรี พระนคร. (2559). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบกฤษณา (Aqilaria sinensis). วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์, 3, 21-24.

Berger, L. R., & Reynold, D. M. (1958). The Chitinase System of a Strain of Griseus. Biochimica et Biophysica Acta, 29 (3), 522–534.

Brand, W. W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm.-Wiss. u.-Technol, 28 (1), 25-30.

Chernin, L. S., Fuente, L. D., Sobolev, L. V., Haran, S., Vorgias, C. E., Oppenheim, A. B. & Chet, I. (1997). Molecular Cloning, Structural Analysis, and Expression in *Escherichia coli* of a Chitinase Gene from *Enterobacter agglomerans*. Applied and Environmental Microbiology, 63 (3), 834–839.

Kidibulea, P. E., Santos-Morianob, P., & Ploub, F.J. (2020). Endo-chitinase Chit33 Specificity on Different Chitinolytic Materials Allows the Production of Unexplored Chitooligosaccharides with Antioxidant Activity. Biotechnology Reports, 27, 1-9.

Moon, C., Seo, D., Song, Y., Hong, S., Choi, S., & Jung, W. (2017). Antifugal Activity and Patterns of N-acetyl-chitooligosaccharide Degradation via Chitinase Produced from *Serratia marcescens* PRNK-1. Microbial Pathogenesis, 113, 218-224.

Park, J. E., Park, C. J., Sakchaisri, K., Karpova, T., Asano, S., McNally, J., Sunwoo, Y., Leem, S.H., & Lee, K. S. (2004). Novel Functional Dissection of the Localization-Specific roles of Budding Yeast Polo Kinase Cdc5p. Journal of Molecular Cell Biology, 24 (22), 73-86.

Santhi, P., Maneerote, J., & Pramvadee, T. (2016). A Study of the Antioxidant Activities and Polyphenol Oxidase inhibitory effects of Several Commercial Mushroom Trimming Extracts and its Application on Inhibiting Melanosis in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Naresuan University Journal: Science and Technology, 24 (2), 207-217.

Senol, M., Nadaroglu, H., Dikbas, N., & Kotan, R. (2014.) Purification of Chitinase Enzymes from *Bacillus subtilis* Bacteria TV-125, Investigation of Kinetic Properties and Antifungal Activity against *Fusarium culmorum*. Analytical of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 13 (1), 3-41.

Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Evaluation of some Essential Oils as Botanical Fungitixicants in Management of Post-harvest Rotting of Citrus Fruits World. Journal of Microbiology and Biotechnology, 20, 317-321.

Yin, C., Kikuchi, K., Hochgreb, T., Poss, K. D., & Stainier, D. Y. (2010). Hand 2 Regulates Extracellular Matrix Remodeling Essential for Gut-Looping Morphogenesis in Zebrafish. Journal of Signal Transduction, 18 (6), 973-984.

Yong, H, K., Seur, K. P., Jin, Y. H., & Young, C. K. (2017). Purification and Characterization of a Major Extracellular Chitinase from a Biocontrol Bacterium, *Paenibacillus elgii* HOA73. The Plant Pathology Journal, 33 (3), 318-328.